トリプル四重極 GC/MS システムとバックフラッシュ機能を使用した高速メソッドによる粉ミルク/大豆製品中のメラミンとその類似化合物のスクリーニングおよび確認

アプリケーションノート

食品

著者

Stephan Baumann
Agilent Technologies, Inc.
5301 Stevens Creek Blvd
Santa Clara CA 95051
USA

概要

Agilent 7890A/7000A シリーズトリプル四重極 GC/MS システムと パージ付 Ultimate ユニオンのバックフラッシュ機能を使用して、粉ミルク/大豆食品中のメラミン、アンメリド、アンメリン、およびシアヌル酸のスクリーニングおよび確認を行うための高速メソッドを開発しました。抽出および誘導体化の手順は、米国食品医薬品局 (FDA) の GC/MS メソッドの手順と同じです。0.16 ～ 2.5 ppm の範囲で優れた直線性 ($R^2 > 0.99$) が得られ、分析は 15 分未満で完了しました。

Agilent Technologies

はじめに

メラミンによる食品の偽装は、米国で製造された粉ミルクや、カナダで流通していたチョコレート、オランダで販売されていたビスケット、タイのコンデンスミルク、香港の卵などからメラミンが検出されたことから、にわかに国際的な問題となりました。これを受け、多くの国々が米国食品医薬品局 (FDA) の最大残留限界 (MRL) に準拠し、乳児用粉ミルクについては 1 ppm、その他の製品については 2.5 ppm というメラミンの許容限度を設けました。FDA の GC-MS スクリーニングメソッド [1] では、メラミンとその類似化合物 (アンメリン、アンメリド、およびシアヌル酸) の 2.5 ppm の濃度での検出が可能です。しかし、2009 年 2 月の FDA 輸入警報では、MRL を順守するためにメラミンとその類似化合物を 0.25 ppm 感度で検出できるような検査メソッドの使用が要求されています。したがって、新たな規制下では、メラミンとその類似化合物のスクリーニングにこのメソッドは使用できなくなり、確認には追加のメソッドが必要になります。

本アプリケーションノートでは、新しい Agilent 7000A シリーズトリプル四重極 GC/MS システムに合わせた FDA GC-MS メソッドの修正について説明します。新しいメソッドでは、サンプル抽出や誘導体化の手順は従来通りですが、分析時間を 15 分以内に抑える目的からパージ付ユニオンによるバックフラッシュが採用されています。メラミンと全類似化合物の検出が、高い再現性と定量精度を維持したまま、0.25 ppm の濃度で可能になります。最も重要なことは、このメソッドによりメラミンと類似化合物のスクリーニング/定量/確認が 1 回の分析で短時間に行えるようになるという点です。

実験

標準品および試薬類

使用した標準品と試薬類を表 1 にまとめます。それぞれ 1,000 µg/mL の濃度のメラミン、アンメリド、アンメリン、およびシアヌル酸の原液を DEA/H20 混合液 (混合比 20:80) で個別に調製し、4 °C で保存しました。内部標準溶液 (2,6-ジアミノ-4-クロロピリミジン、すなわち DACP) は、ピリジンを溶媒として 57.7 ng/mL の濃度で調製しました。上記の各溶液を使用して、FDA メソッド [1] に規定されているマトリックスの一致した標準溶液を調製しました。マトリックスは FDA のご厚意により提供されたものです。

表 1.　標準品および試薬類

標準品	メラミン	Sigma-Aldrich	99% を超える純度
	シアヌル酸	TCI-America	>98.0%
	アンメリド	TCI-America	>98.0%
	アンメリン	TCI-America	>95.0%
	内部標準 †	Sigma-Aldrich	98%
溶媒	ジエチルアミン (DEA)	Sigma-Aldrich	SigmaUltra グレード
	ピリジン	Fisher Scientific	認定 A.C.S. 試薬
	アセトニトリル	Fisher	HPLC グレード
シリル化剤	BSTFA with 1% TMCS* (SYLON BFT)	Sigma-Aldrich	誘導体化グレード

† DACP (2,6- ジアミノ -4- クロロピリミジン)
* BSTFA:ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド、TMCS: トリメチルクロロシラン

機器

実験に使用したシステムは、スプリット/スプリットレスキャピラリ注入口を装備した Agilent 7890A GC、Agilent 7000A シリーズトリプル四重極 GC/MS および Agilent 7683B オートサンプラ (ALS) という構成です。スプリット/スプリットレス注入口には、長寿命セプタム (部品番号 5183-4761) と、不活性処理済みスプリットレスシングルテーパ注入ライナ (部品番号 5181-3316) を取り付けました。注入は 10 µL シリンジ (部品番号 9301-0714) で行いました。機器の条件を表 2 に示します。

表 2.　GC/MS 条件

GC条件	
カラム	2 本の 15 m × 0.25 mm × 0.25 µm HP-5ms カラム (部品番号 19091S-431)
注入口温度	280 °C
注入口圧力	12.9 psi
キャリアガス	ヘリウム、定流量モード、1.2 mL/min
パルスドスプリットレス	25 psiで0.5 min
オーブンプログラム	100 °C (1 分間保持)、10 °C/min で 210 °C まで
カラム線速度	41 cm/s
注入量	1µL
トランスファーライン温度	290 °C
GC ポストラン条件	
バックフラッシュ装置	パージ付 Ultimate ユニオン (部品番号 G3186-60580) を圧力制御モジュール (部品番号 G3476-60501) で制御
バックフラッシュ条件	300 °C で –3.6 mL/min (1.3 分間)
MS 条件	
チューニング	オートチューン
Delta EM	電圧 400 V
測定モード	EI; SRM (selected reaction monitoring)
溶媒ディレイ	6 min
MS 温度	イオン源 230 °C; 四重極 150 °C

サンプル調製

サンプルの代表的な部分 0.5 g を 50 mL のポリプロピレン製遠心分離管に量り取りました。DEA/水/アセトニトリル (混合比 10/40/50) の抽出溶媒 20 mL をサンプルに加えました。ジエチルアミンによってメラミンとシアヌル酸の複合体が分離するため、偽陰性と判定される危険性が減ります。また、ジエチルアミンは、従来の抽出溶媒での溶解度が極端に低いアンメリドやアンメリンの溶解度も高めます。サンプルのキャップを締め、ボルテックスミキサーで撹拌してから、超音波振とう器に 30 分かけました。5,000 G 以上で 10 分間遠心分離したのち、上澄み液を 0.45-µm のナイロンフィルタでろ過しました。

誘導体化

160-µL のろ過液をガラス製の GC バイアルに移しました。これを約 70 °C の窒素気流下で乾固させ、600 µL の内部標準溶液と 200 µL の BSTFA + 1% TMCS 溶液を加えました。サンプルをボルテックスミキサーで撹拌し、70 °C で 45 分間加熱してから注入しました。

分析パラメータ

メラミンとその類似化合物や内部標準の分析に使用したパラメータを表 3 にまとめます。

表 3.　分析パラメータ

		トリプル四重極 GC/MS		
化合物名	RT	SRM	ドゥエルタイム (ms)	コリジョンエネルギー (EV)
メラミン	12.467	327 → 171	20	17
		342 → 285	150	20
		342 → 213	150	22
アンメリド	10.801	344 → 171	50	22
		344 → 214	50	15
		329 → 171	50	20
アンメリン	11.748	328 → 171	50	25
		343 → 214	50	20
		343 → 171	50	30
シアヌル酸	9.613	345 → 215	50	8
		345 → 188	50	12
		330 → 215	50	4
DACP (内部標準) 2,6-ジアミノ-4-クロロピリミジン	11.185	273 → 237	150	12
		273 → 99	150	20

結果と考察

パージ付 Ultimate ユニオンシステムによるバックフラッシュ

各測定の前にカラムから沸点の高い物質を除去するため、バックフラッシュを採用しました。この構成では、溶出の遅いピークはカラム全体を通過して MS 検出器に送り込まれるのではなく、注入口スプリットフローベントから排出されます。バックフラッシュにより化学的なノイズが減って分析のサイクルタイムが短くなるため、スループットが高まります。カラムや MS 検出器のメンテナンスが減ることになるため、システムの稼働率も高まります。アジレントの CFT (キャピラリ・フロー・テクノロジー) モジュールは、分離能を高めるためにデッドボリュームを小さくした、簡単で迅速なバックフラッシュを可能にするアジレント独自のソリューションと、リークを防ぐフェラルおよびフィッティングから構成されています。すべての CFT モジュールは、第 2 のガス供給源からのカラムまたは検出器へのカラムフローを精密に制御するため、補助的な電子式圧力/流量制御 (EPC) モジュールまたはニューマティックコントロールモジュール (PCM) を使用する必要があります。通常運転時の PCM 圧力は、カラムを通過するキャリアガスの圧力と同じか、もしくは若干高くなっています。バックフラッシュ時には、注入口圧力を 1 psi に落として PCM 圧力を上げ、カラム内のフローを逆流させて注入口のベントラインから排出します。

バックフラッシュの方式としては、このほかに、分析用カラムの中央部に CFT 装置を取り付けるというユニークな方法があります [2、3]。30 m のカラムを使用する代わりに、15 m のカラムを 2 本使用して超低デッドボリュームの パージ付 Ultimate ユニオンでつなげます (図 1)。PCM は、最初のカラムから流れてくるキャリアガスとちょうど同じ量のメークアップガスを添加します。したがって、ガス流量の増加は極めて僅かなもので、最適な量ではないキャリアガスが質量分析計へ流れ込むことによって生じる感度の低下もほとんどありません。この構成では、第 1 カラムの流量と圧力を下げ、第 2 カラムの流量と圧力を上げるという形でバックフラッシュが実行されます。

図 2 は、パージ付きユニオンの構成によるバックフラッシュの例を示したものです。一番上のクロマトグラムには 6 つの標準物質が示されています。3 番目のピークは最後の分析対象化合物と考えられ、4 番目のピークは溶出の遅い最初の干渉物質です。

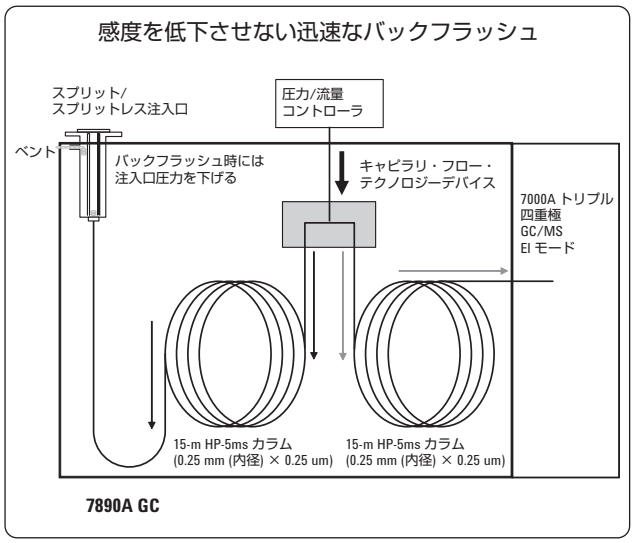

図 1.　パージ付 Ultimate ユニオン GC/MS 構成の配管図

真ん中のクロマトグラムは、10.1 分の時点でバックフラッシュを開始して同じ標準物質を分析したときのクロマトグラムです。最初の 15 m カラムの流量を下げてバックフラッシュを開始した時点 (ポイント a) と、2 番目のカラムの流量を上げた時点 (ポイント b) が示されています。ポイント a からポイント b までの時間が、2 番目のカラムにおける最後の対象化合物の残留時間です。最後の分析対象化合物は保持されますが、そのあとに溶出する物質は MS 検出器へ送られません。一番下のクロマトグラムは、このあとに行ったブランク分析のクロマトグラムです。残留物質のないことが分かります。バックフラッシュの開始時期は、最後の分析対象化合物のピークが溶出したあと (ポイント b) にすることもできます。その場合、サイクルタイムは若干延びますが、実験によって最後の対象化合物の残留時間を調べる必要はなくなります。

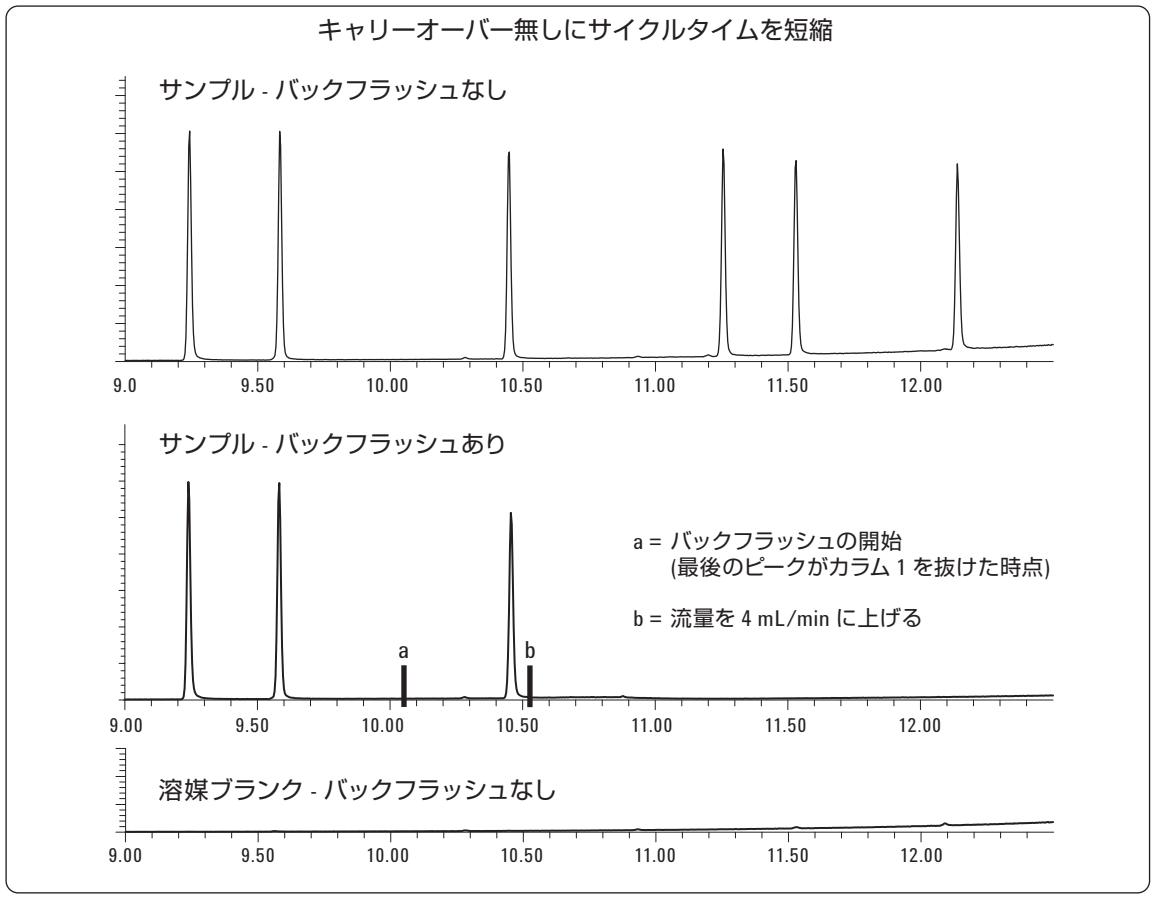

図 2.　パージ付 Ultimate ユニオン構成によるバックフラッシュ。一番上: バックフラッシュなし。中央: バックフラッシュは 10.1 分の時点 (ポイント a) から始まり、3 番目の分析対象化合物が 2 番目のカラムで溶出しきる (ポイント b) まで続いています。一番下: そのあとのブランク注入では残留物質は見られません。

メラミンとその類似化合物の分析

トリプル四重極 GC/MS システムで開発されたこのメソッドは、15 分未満の 1 回の分析で、メラミン、アンメリン、アンメリド、シアヌル酸の優れた分離および分析を実現します (図 3)。図 4 の分析結果に鮮明に現れている通り、新しい Agilent 7000A シリーズトリプル四重極 GC/MS メソッドでは、GC/MS SIM メソッドと比較して感度と選択性が大幅に向上します。新しいメソッドでは、定量トランジションに 0.25 ppm のメラミンが非常にきれいに検出されますが、GC/MS SIM メソッドでは、どのような SIM イオンを使用しても、2.5 ppm のメラミンに対して化学ノイズを効果的に抑制できません。

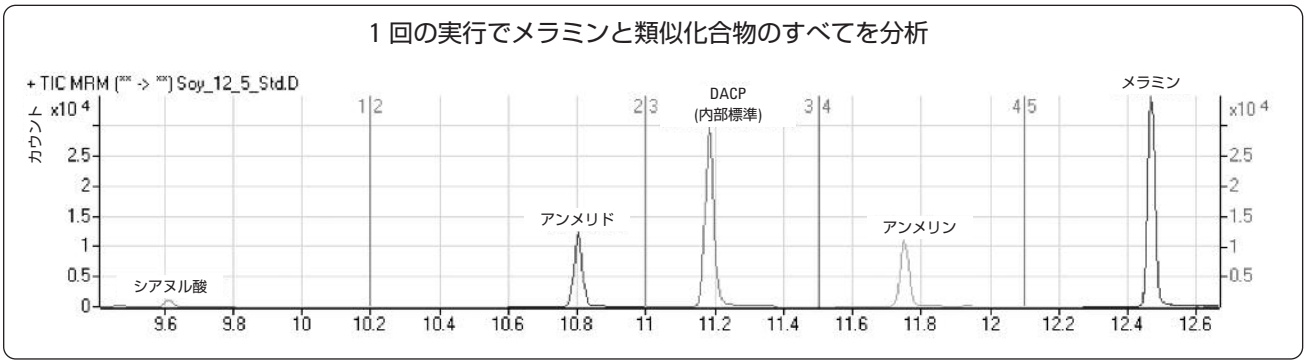

図 3. SRM 分析から得られたトータルイオンクロマトグラム (TIC)。メラミンとその類似化合物に関する分離が示されている。

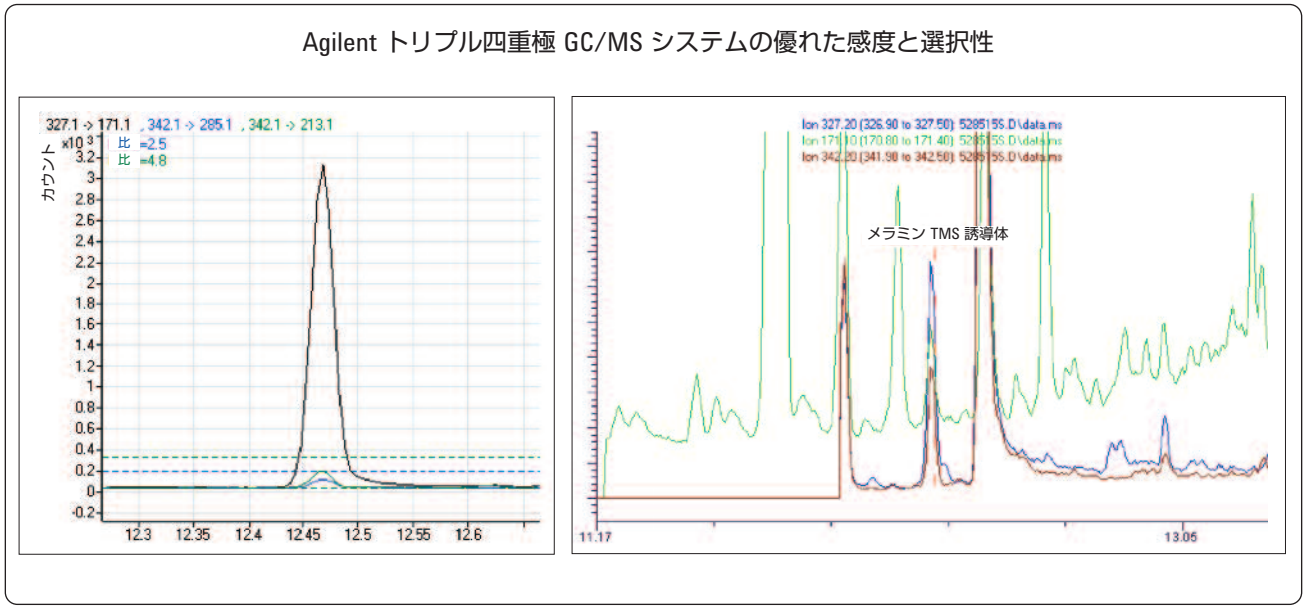

図 4. 大豆食品中のメラミンに関する検出結果の比較。0.25 ppmでのトリプル四重極 GC/MS メソッドによる検出結果 (a) と 2.5 ppmでの GC/MS SIM メソッドによる検出結果 (b)。トリプル四重極 GC/MS メソッドで使用した定量トランジションは *m/z* 327.1→171.1 で、定性トランジションは *m/z* 342.1→295.1 (定量トランジションのピーク面積の 2.5%) および *m/z* 342.1→217.1 (ピーク面積の 4.8%)でした。(a) には不確かさを表すバンドも示されています。GC/MS メソッドで使用した SIM イオンは、*m/z* 342.2, 327.2、および 171.1 (b) でした。

感度と定量

0.16 ～ 2.5 ppm という検出レベルに合わせて、メラミンと 3 つの類似化合物は、0.78、1.25、3.9、および 12.5 ng/mL の濃度で (粉ミルクと大豆食品の) マトリックスに添加されました。4 化合物について、粉ミルクと大豆製品の両方のマトリックス検量線が引かれました。図 5 および 6 は、メラミンと 3 つの類似化合物について優れた直線性が見られ、1.00 に極めて近い R^2 値が得られたことを示しています。表 4 および 5 に示すように、4 つの化合物のすべてについて、どちらのマトリックスにおいても定量の精度は極めて高いものでした。

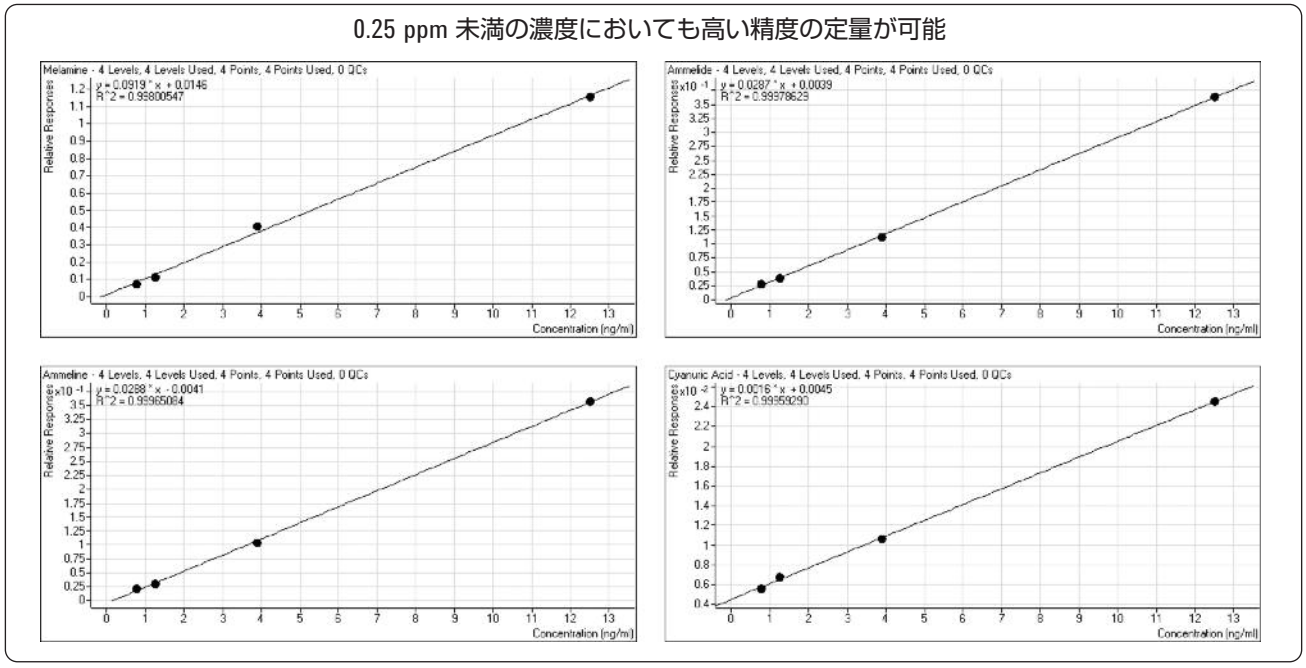

図 5.　粉ミルク中のメラミンとその誘導体の定量に用いられた直線の検量線

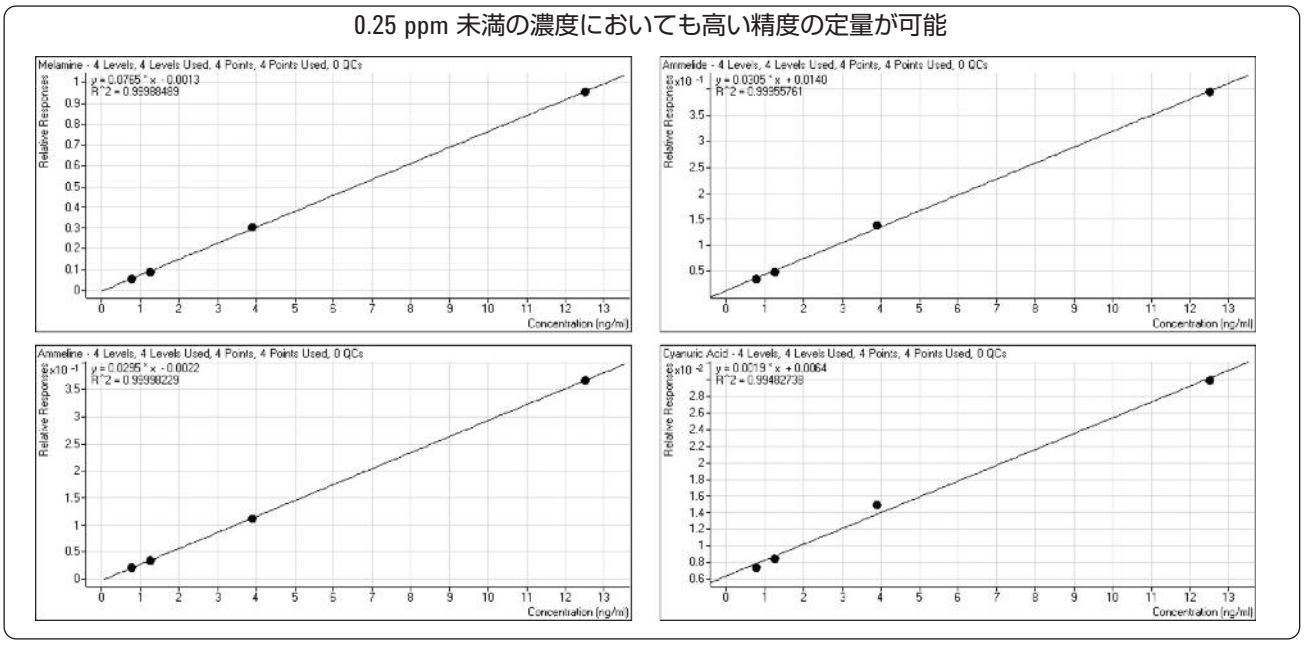

図 6.　大豆食品中のメラミンとその誘導体の定量に用いられた直線の検量線

表 4.　粉ミルク中のメラミンとその誘導体の定量性に関するデータ (マトリックスの一致した標準溶液を使用)

	標準溶液の濃度 (ng/mL)	測定濃度 (ng/mL)	定量の精度 (%)
メラミン	0.78	0.79	101.3
	1.25	1.23	99.1
	3.90	4.39	112.5
	12.5	12.50	100.0
アンメリド	0.78	0.86	110.3
	1.25	1.25	99.9
	3.90	3.79	97.2
	12.5	12.52	100.2
アンメリン	0.78	0.90	115.5
	1.25	1.22	97.2
	3.90	3.78	97.0
	12.5	12.52	100.3
シアヌル酸	0.78	0.67	86.1
	1.25	1.40	111.9
	3.90	3.85	98.8
	12.5	12.51	100.1

表 5.　大豆食品中のメラミンとその誘導体の定量性に関するデータ (マトリックスの一致した標準溶液を使用)

	標準溶液の濃度 (ng/mL)	測定濃度 (ng/mL)	定量の精度 (%)
メラミン	0.78	0.76	97.7
	1.25	1.20	96.3
	3.90	3.98	102.2
	12.5	12.48	99.8
アンメリド	0.78	0.72	92.9
	1.25	1.18	94.2
	3.90	4.07	104.4
	12.5	12.46	99.7
アンメリン	0.78	0.81	103.7
	1.25	1.22	97.9
	3.90	3.90	99.9
	12.5	12.50	100.0
シアヌル酸	0.78	0.71	91.3
	1.25	1.22	94.5
	3.90	4.49	115.1
	12.5	12.01	96.1

確認

同定ポイント制は、規制物質の含有量を科学的に確認する手順を定義する目的から、EU の科学者たちによって開発されたものです。分析メソッドによって提供される同定ポイントが高いほど、化合物の確認の確度が高くなります。最大残留限界 (MRL) 値の定められている化合物には 3 点の同定ポイントが必要です。毒性があるために MRL の定義できない化合物は、どのような濃度でも使用が禁止されます。こうした化合物には 4 点の同定ポイントが必要です。GC/MS メソッドで 4 点の同定ポイントを獲得するには 4 つのイオンをモニターする必要がありますが、トリプル四重極 GC/MS/MS メソッドを使用する場合には、2 つの SRM トランジションをモニターすれば獲得できます。トリプル四重極 GC/MS システムによるメラミンとその類似化合物の分析では、1 回の分析でスクリーニングと陽性確認を同時に行うため、化合物ごとに最低 2つの SRM トランジションがモニターされました。

図 7 と図 8 は、粉ミルクと大豆食品中の 4 つの化合物の GC 分離に関する定量トランジションと定性トランジションの結果を示したものです。どちらのトランジションからも同じピーク形状が得られることを分かりやすく示すために、どのケースについても、定性トランジションは定量トランジションに合わせてノーマライズしてあります。したがって、これらのトランジションは、それぞれのサンプルマトリックスにおける各化合物の陽性確認に使用できます。

結論

メラミン、アンメリド、アンメリン、シアヌル酸のスクリーニングを行う FDA GC/MS メソッドを、Agilent トリプル四重極 GC/MS システムを用いて1 回の分析でスクリーニングと定量と確認を同時かつ短時間に実行できるように修正しました。このメソッドは抽出や誘導体化の手順変更を必要とせず、サイクルタイムは約 15 分です。さらに、このメソッドは 0.25 ppm という FDA の新たな感度要件を満たし、2.5 ppm までの定量に優れた直線性を示します。定量精度は 97% を超え、また、4 つの化合物のそれぞれについて 2 つの SRM トランジションがモニターされているため、陽性確認について十分な同定ポイントが得られるようになっています。

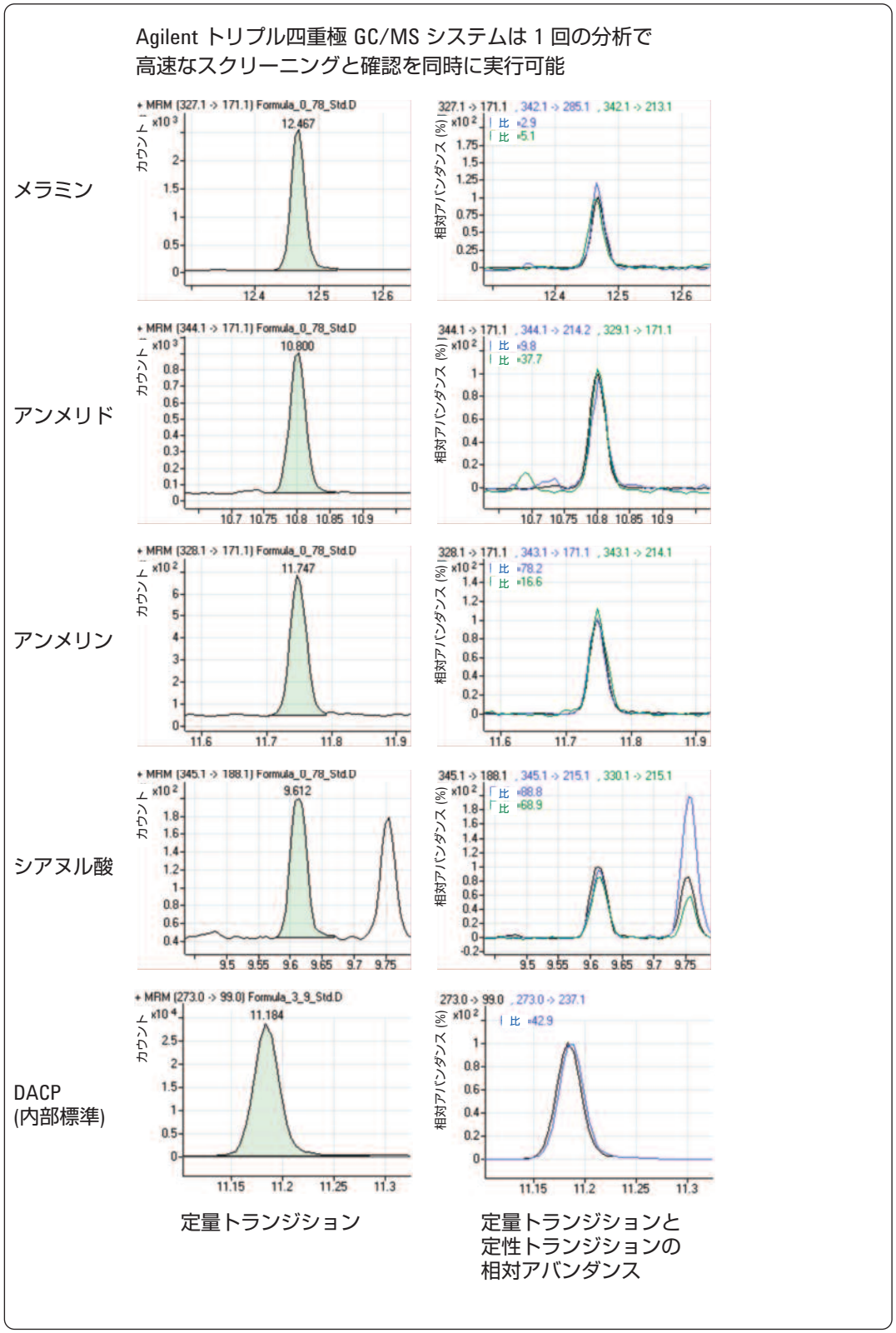

図 7.　Agilent トリプル四重極 GC/MS システムは 1 回の分析で確認とスクリーニングを同時に実行: 粉ミルク中に 0.78 ng/mL の濃度で存在するメラミンとその類似化合物に関する定量トランジションとノーマライズされた定性トランジション

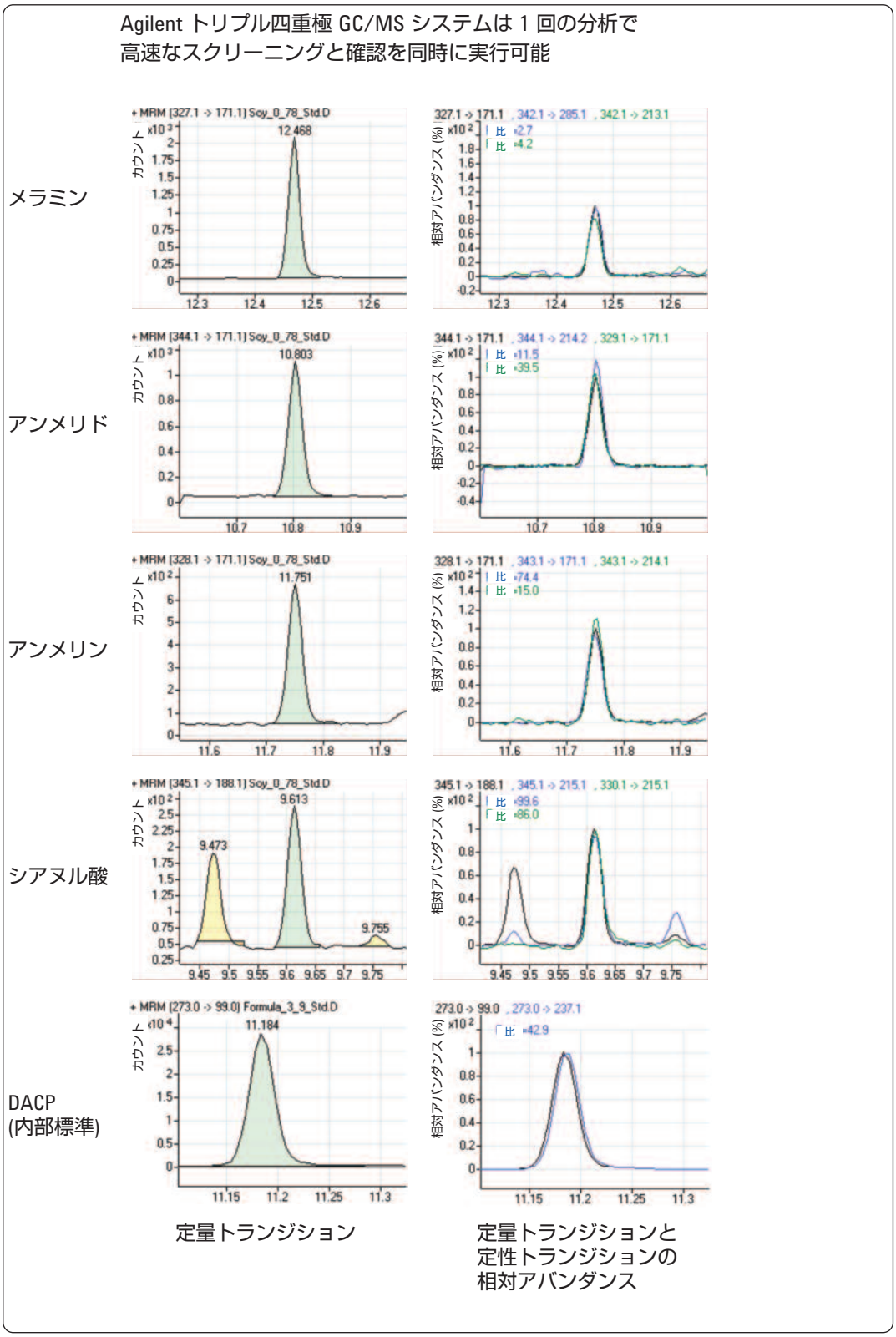

図 8.　大豆食品中に 0.78 ng/mL の濃度で存在するメラミンとその類似化合物に関する定量トランジションとノーマライズされた定性トランジション

謝辞

ガイダンスと資料を提供いただいた食品医薬品局パシフィックノースウェスト国立研究所の Greg Mercer 氏に謝意を表します。

参考文献

1. U.S. Food and Drug Administration, “GC-MS Screen for the Presence of Melamine, Ammeline, Ammelide, and Cyanuric Acid,” LIB No. 4423, Volume 4, October 2008.
2. H. Prest, C. Foucault and Y. Aubut, “Capillary Flow Technology for GC/MS: Efficacy of the Simple Tee Configuration for Robust Analysis Using Rapid Backflushing for Matrix Elimination,” Agilent Technologies publication 5989-9359EN.
3. H. Prest, “GC/MSのキャピラリ・フロー・テクノロジー: シンプルな分岐デバイスによる高速マトリクスバックフラッシュ付き微量分析システム” 資料番号 5989-8664JAJP.

詳細情報

アジレントの製品およびサービスの詳細は、弊社ウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2009
Printed in Japan
June 8, 2009
5990-4071JAJP

Agilent Technologies